

10/069652
PCT/JPGO/06342

日本国特許庁

18.09.00 #2

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JPOO/6342

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 9月17日

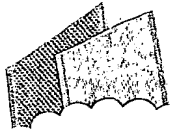
REC'D 06 NOV 2000

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第263145号 EKV

出願人
Applicant(s):

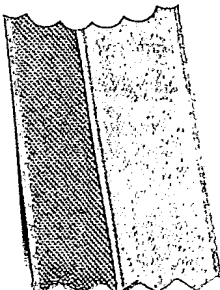
興和株式会社



PRIORITY
DOCUMENT

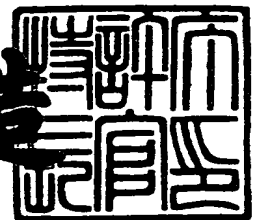
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月20日



特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3085361

【書類名】 特許願
 【整理番号】 P99-015
 【提出日】 平成11年 9月17日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 G01N 21/00
 【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 - 2 5 - 5 興和株式会社 興
 和総合科学研究所内

【氏名】 薮崎 克己

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県蒲郡市宮成町 1 3 番 3 5 号 興和株式会社 電機
 光学事業部 蒲郡工場内

【氏名】 新野 雅夫

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県蒲郡市宮成町 1 3 番 3 5 号 興和株式会社 電機
 光学事業部 蒲郡工場内

【氏名】 松井 宏樹

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 - 2 5 - 5 興和株式会社 興
 和総合科学研究所内

【氏名】 石川 宗▲晴▼

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 1 - 2 5 - 5 興和株式会社 興
 和総合科学研究所内

【氏名】 廣野 泰亮

【特許出願人】

【識別番号】 000163006

【氏名又は名称】 興和株式会社

【代理人】

【識別番号】 100075292

【弁理士】

【氏名又は名称】 加藤 卓

【電話番号】 03(3268)2481

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003089

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛍光粒子撮像装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛍光色素で染色した蛍光粒子を撮像する撮像装置において、
蛍光粒子を底部に集積させて収容する撮像用容器と、
蛍光粒子を励起させる励起光を発生する手段と、

励起光で撮像用容器の底部近傍のみを側面から照明する第 1 の照明手段と、
励起光で撮像用容器の底部を底面側から照明する第 2 の照明手段と、
第 1 と第 2 の照明手段を切り替える切替手段と、

第 1 あるいは第 2 の照明手段で照明される撮像用容器の底部を底面側から撮像する撮像手段と、

を有することを特徴とする蛍光粒子撮像装置。

【請求項 2】 前記切替手段が、第 1 の切替位置にあるときは、励起光を撮像用容器の底部側面に導き、第 2 の切替位置にあるときは、励起光を撮像用容器の底面に導く光学素子であることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光粒子撮像装置。

【請求項 3】 撮像用容器の底部側面照明用の励起光源と、撮像用容器の底面照明用の励起光源を設け、切替手段によりいずれか一方の励起光源からの励起光に切り替えることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光粒子撮像装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、蛍光粒子撮像装置、更に詳細には、蛍光色素により染色された白血球などの蛍光粒子を撮像する蛍光粒子撮像装置に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、医療の分野で血液から血小板及び赤血球を抽出した血小板製剤及び赤血球製剤が製造されている。この血小板製剤及び赤血球製剤はいずれも輸血に供されるものであり、その中に混入している白血球は好ましいものではない。そのた

めに上記製剤において白血球の混入数を知ることが重要になる。従来は、ナジェットチャンバーと呼ばれるスライドガラスプレートに染色色素によって染色されたサンプル血小板製剤を入れ照明光を照射し顕微鏡にて白血球の数をかぞえている。具体的には、50 μ リットルをとり、この中の白血球数をかぞえることで全バッグ中の白血球数に換算している。この作業は慣れた人が時間をかけて行なわなければならない、極めて非能率的で疲れるものであった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

これらの作業を能率的に行なう装置として、特開平11-183382号公報に開示されているような蛍光粒子撮像装置がある。この装置では、蛍光色素で染色した蛍光粒子（白血球）が撮像用容器の底部に集積されて収容されており、励起光により撮像用容器の底部近傍のみが照明されて、蛍光粒子が励起されている。そして、撮像用容器の底部が底面側から撮像されて、蛍光粒子が計数されている。

【0004】

ここで開示された手段では、血小板製剤、血漿製剤、髄液などのように励起光の透過率が高いものでは非常に有用である。また、赤血球製剤では、遠心作用により、赤血球と白血球を分離しているが除去率は1割程度で多量の白血球が混入する。その場合には赤血球製剤を希釈して微量のサンプル中の白血球数を減らして数をかぞえ、希釈倍率を考慮して全バッグ内の白血球数に換算している。この場合には赤血球製剤であっても励起光の透過率は高く開示された発明は有用である。

【0005】

しかるに、白血球混入数の少ない赤血球製剤では希釈する必要がないため、励起光の透過率が低く底部に集積した白血球に均一に励起光が照射されず正確な数をかぞえることが困難である。

【0006】

従って、本発明は、被測定物の励起光に対する透過率が異なっても正確に蛍光粒子数を計測することが可能な蛍光粒子撮像装置を提供することをその課題

としている。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明では、上記課題を解決するために、蛍光色素で染色した蛍光粒子を撮像する撮像装置において、蛍光粒子を底部に集積させて収容する撮像用容器と、蛍光粒子を励起させる励起光を発生する手段と、励起光で撮像用容器の底部近傍のみを側面から照明する第1の照明手段と、励起光で撮像用容器の底部を底面側から照明する第2の照明手段と、第1と第2の照明手段を切り替える切替手段と、第1あるいは第2の照明手段で照明される撮像用容器の底部を底面側から撮像する撮像手段とを有する構成を採用している。

【0008】

血小板製剤あるいは希釈された赤血球製剤などのように励起光の透過率が高いものが容器に入っている場合には、蛍光粒子が集積している部分以外を照射すると、そこにも蛍光色素が存在するためそれがバックグラウンド光となって撮像された画像のコントラストを劣化させるため、容器の底部近傍のみを側面から照射するのが好ましい。

【0009】

一方、希釈されない高濃度の赤血球製剤などのように励起光の透過率が低いものに対して側面から照射すると、励起光の入射する側では蛍光が得られるが、反対側まで励起光が到達できず十分な蛍光が得ることが困難になるので、容器底部を底面側から照射するのが望ましい。その場合、透過率が低いために励起光は底部近傍にしか到達できず、バックグラウンド光としての蛍光はほとんど発生することはない。

【0010】

そこで、本発明では、照明手段を切り替えることにより、励起光の透過率の高いものに対しては、励起光で容器の底部近傍のみを側面から照射し、一方励起光の透過率が低いものに対しては容器の底部を底面側から照明するようにしている。従って、被測定物の励起光に対する透過率が異なってもそれに応じた最適な照明手段を選択でき、正確に蛍光粒子数を計数することが可能になる。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】

以下、図面に示す実施の形態に基づき本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 2 】

図 1、図 2 には、本発明の一実施形態が図示されており、符号 1 で示すものは、レーザ光源で、例えば緑色の波長のレーザビームを発生する YAG レーザが用いられる。このレーザ光源 1 からのレーザビームの光路には、不図示の切り替え機構により光路に挿脱可能な切替ミラー 20 が配置される。レーザ光源 1 からのレーザビームは、切替ミラー 20 が光路から離脱されているときは、拡散機能を有する部材、例えばスリガラス等で形成される拡散板 2 に入射して拡散され、上部がカバー 4 で覆われた撮像用容器 3 の底部 3' を側面から照射する。この撮像用容器 3 の底部には蛍光粒子が集積しており、蛍光粒子がレーザビームで照射され蛍光を発するようになる。レーザビームで照射された蛍光粒子の像は、対物レンズ 6 を経てミラー 7 で反射され、バリアフィルタ 8 で所定帯域の帯域光が通過され、CCD カメラ 9 で撮像される。

【 0 0 1 3 】

また、切替ミラー 20 が図示したように、光路に挿入されているときは、レーザ光源 1 からの励起光は切替ミラー 20 並びにミラー 21 を介して反射され、拡散板 2 と同様な拡散板 22 で拡散された後、容器 3 の底部を底面側から照射する。レーザビームで照射された蛍光粒子の像は、同様に対物レンズ 6 を経てミラー 7 で反射され、バリアフィルタ 8 で所定帯域の帯域光が通過され、CCD カメラ 9 で撮像される。

【 0 0 1 4 】

CCD カメラ 9 で撮像された蛍光粒子の像は、図 2 に示すように、信号線 10 を介してコンピュータ 12 のビデオキャプチャ 11 でコンピュータに取り込まれ、画像処理回路 13 で画像処理されて、蛍光粒子が認識される。この認識は、蛍光粒子のところでは輝度が変わるので、例えば、信号値を微分することにより蛍光粒子の座標位置を検出して行なうことができる。認識された蛍光粒子は、モニタ 14 に表示される。図 2 には、容器の底部の像 15 並びにその中の複数の蛍

光粒子 15 a がモニタ 14 に表示されている状態が図示されている。また、この蛍光粒子 15 a の数が計数され、その計数値がモニタ 14 の下方部 16 にも表示される。

【0015】

撮像用容器 3 は、透明なポリスチレン樹脂、ガラス、アクリル樹脂、特に好ましくは、ポリスチレン樹脂で一体成型される。撮像用容器 3 には、例えば、血小板製剤、あるいは希釈されたあるいは希釈されない赤血球製剤などが入れられる。また、撮像用容器 3 には、血小板および白血球の細胞質を分解する薬液（トライトン X（商品名））が入れられ、さらに白血球の細胞核を染色する蛍光色素（プロピディウムイオダイド）が入れられ、次に、遠心分離機（不図示）によって白血球の核が容器 3 の底部に沈められる。所定の G をかけるとすべての白血球核は撮像用容器 3 の底部 3' に集積するようになる。

【0016】

このような構成において、撮像用容器 3 に、血小板製剤あるいは 100 倍程度に希釈された赤血球製剤のように励起光の透過率の高いものが入れている場合には、切替ミラー 20 を光路から離脱させ、レーザ光源 1 を点灯して、撮像用容器 3 の底部近傍のみを励起光で側面から照射する。撮像用容器 3 の底部には蛍光色素で染色された白血球が集積しており、染色された白血球の核は、入射したレーザビームで励起されると、600 nm 付近の蛍光を発する。これを容器下部から対物レンズ 6、ミラー 7、バリアフィルタ 8 を介して CCD カメラ 9 で撮像する。なお、バリアフィルタ 8 で蛍光波長の帯域光のみを透過させるので、有害波長光をカットすることができる。

【0017】

レーザビームは、蛍光粒子の集積している容器底部だけを照明し、その底部に集積している白血球を側面から効果的に照明しているので、蛍光色素がなお容器 3 内の溶液中に浮遊していても、これがバックグラウンドとして有害光となるのを防止でき、撮像された画像のコントラストを向上させることができる。CCD カメラ 9 で撮像された蛍光粒子の像は、図 2 に示すように、信号線 10 を介してコンピュータ 12 のビデオキャプチャ 11 でコンピュータに取り込まれ、画像処

理回路 1 3 で画像処理されて、白血球 1 5 a の数が正確に計数される。なお、容器の底部近傍のみを照射するために、それ以外の部分を遮蔽する遮蔽部材を容器の周囲に設けると、さらに好ましい結果が得られる。

【0 0 1 8】

一方、撮像用容器 3 に、希釈されない濃度の高い赤血球製剤が入れているときは、切替ミラー 2 0 を光路に挿入し、レーザ光源 1 からの励起光をミラー 2 1 で上方に反射させ、励起光で撮像用容器 3 の底部を底面側から照射する。これにより容器の底部に集積した白血球は蛍光を発するので、側面照射のときと同様に、白血球の数が蛍光粒子の数として計数される。なお、励起光は赤血球製剤により吸収され、赤血球製剤に対して透過率が低くなるため、励起光は底面側から入射されても、底部近傍にしか到達できず、バックグラウンド光としての蛍光はほとんど発生しないので、コントラストの高い画像が得られ、同様に、白血球の数を正確に計数できるようになる。

【0 0 1 9】

なお、上述した実施形態では、一個のレーザ光源からのビームを、切替ミラーにより切り替え、容器の底部を側面から照射したり、あるいは底面側から照射している。これに代えて、側面照射用のレーザ光源と、底面照射用のレーザ光源を個別に設け、容器の底部を側面から照射する場合には、そのためのレーザ光源を点灯し、あるいは底面側から照射する場合には、そのためのレーザ光源を点灯するようにしてもよい。あるいは両レーザ光源を点灯しておいて、側面照射か、底面照射かに応じて、いずれかのレーザビームをシャッタ等で遮断していずれかの照射に切り替えるようにすることも可能である。

【0 0 2 0】

【発明の効果】

以上の説明から明らかなように、本発明では、励起光の透過率の高いものに対しては、励起光で容器の底部近傍のみを側面から照射し、一方励起光の透過率が低いものに対しては容器底部を底面側から照射するようにしているので、被測定物の励起光に対する透過率が異なってもそれに応じた最適な照明が得られ、蛍光粒子数を正確に計数することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

蛍光粒子撮像装置の概略構成を示す構成図である。

【図 2】

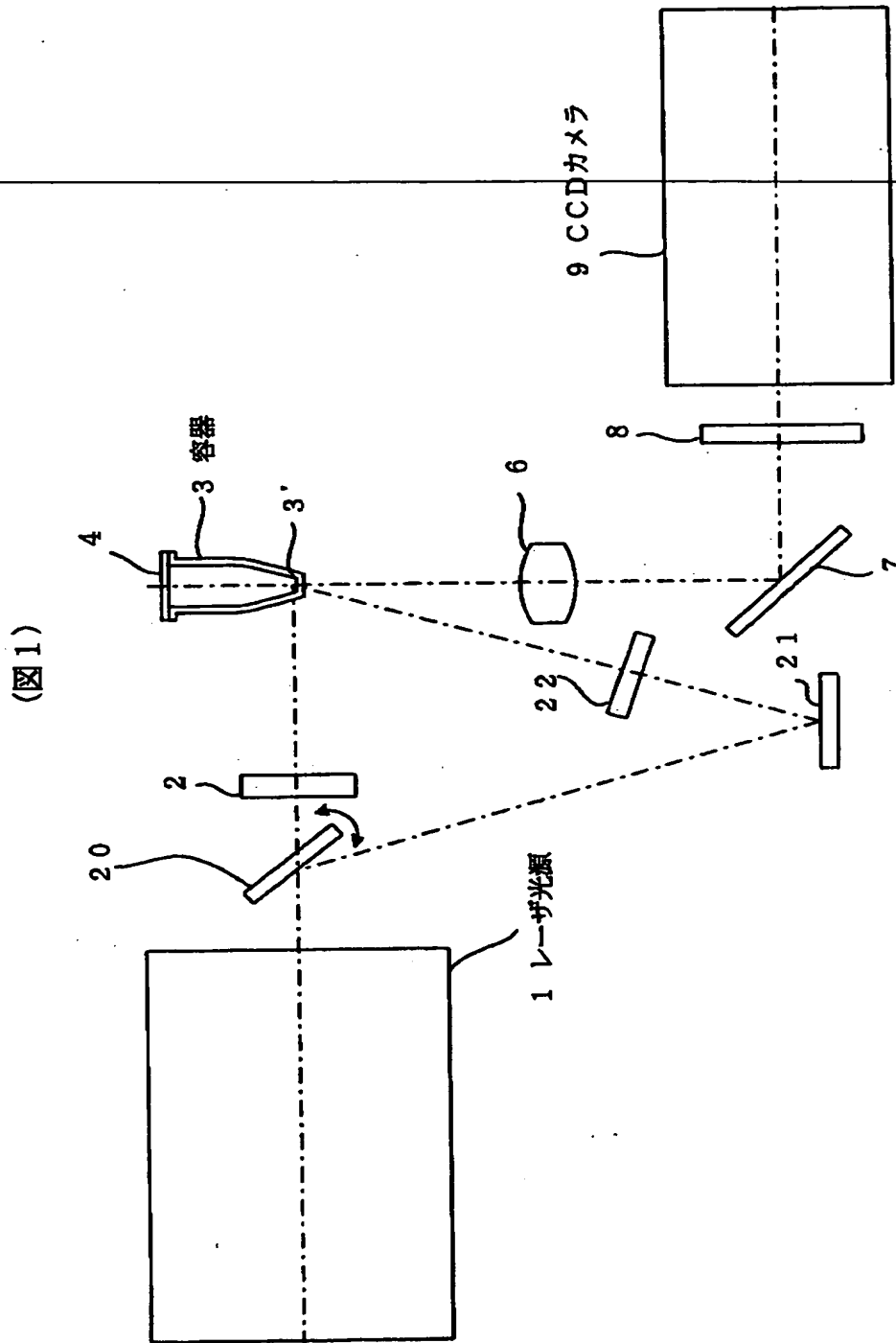
撮像された蛍光粒子の像を解析並びに表示する装置を示した正面図である。

【符号の説明】

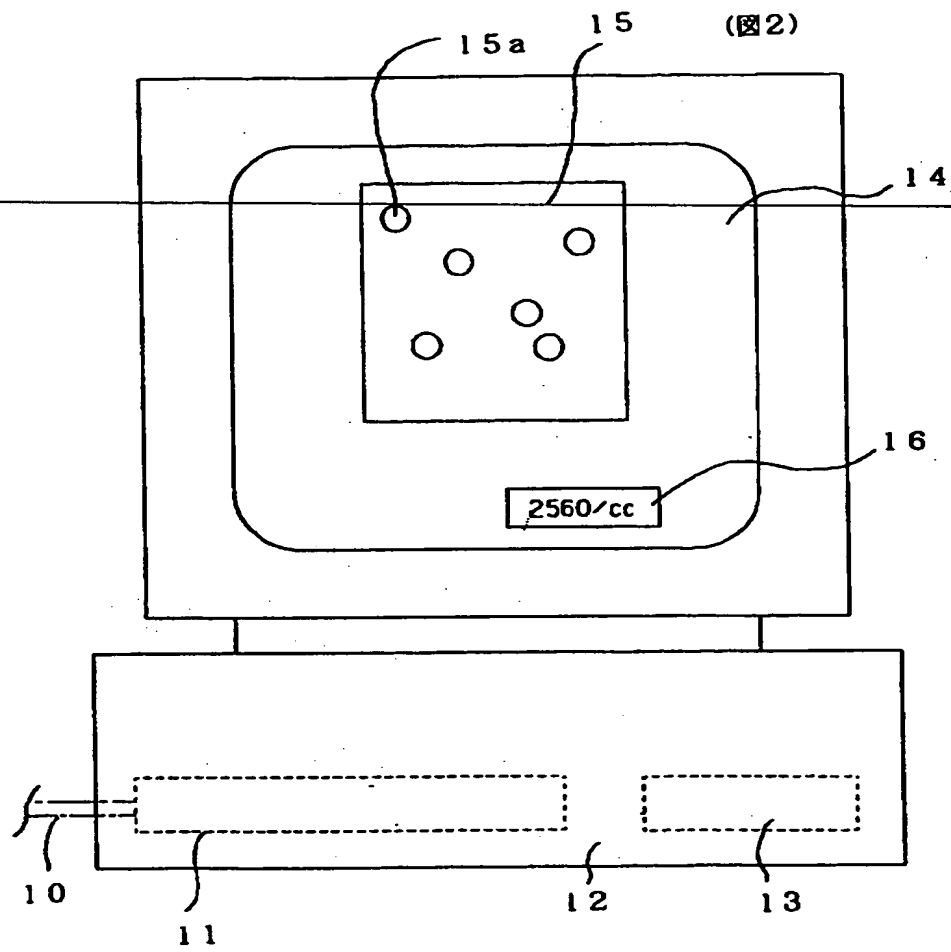
- 1 レーザ光源
- 2 拡散板
- 3 撮像用容器
- 8 バリアフィルタ
- 9 CCDカメラ
- 20 切替ミラー

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 バックグラウンド光の影響を低減させ、蛍光粒子を良好に撮像できる蛍光粒子撮像装置を提供する。

【解決手段】 蛍光色素で染色した蛍光粒子を底部に集積させて収容する撮像用容器 3 が設けられる。血小板製剤あるいは希釈された赤血球製剤などのように励起光の透過率が高いものが容器に入っている場合には、ミラー 20 を光路から離脱させて、励起光で容器の底部近傍のみを側面から照射する。蛍光色素が容器内の溶液中にあってもこれが有害光となるのを防止できる。高濃度の赤血球製剤などのように励起光の透過率が低いものに対しては、ミラー 20 を光路に挿入して容器底部を底面側から照射する。その場合、透過率が低いために励起光は底部近傍にしか到達できず、バックグラウンド光としての蛍光はほとんど発生しない。励起光の透過率が異なってもそれに応じた照明を選択できるので、蛍光粒子数を正確に計数できる。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000163006]

1. 変更年月日	1990年 8月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号
氏 名	興和株式会社